

Ad-IL-24 对人胶质瘤细胞生长抑制效应的体外实验

单云波, 盛伟华, 谢宇锋, 刘铁连, 井莹莹, 胡志清, 杨吉成

苏州大学医学部基础医学与生物科学学院 细胞与分子生物学教研室, 苏州 215123

摘要: 研究携带人白介素 24(IL-24)的腺病毒表达载体(Ad-IL-24)对人 U251 胶质瘤细胞生长的影响和抗肿瘤分子机制。将不同 MOI Ad-IL-24 感染 U251 人胶质瘤细胞后, MTT 法检测 Ad-IL-24 对 U251 细胞生长的抑制作用, 流式细胞仪和 Hoechst 染色法检测细胞的凋亡率。RT-PCR 检测 *bcl-2*、*bax*、*ICE*、*C-myc*、*HIF-1 α* 和 *p53* 等基因的转录表达水平, Western blotting 检测 Cleaved Caspase-3 的表达。结果表明 100 MOI Ad-IL-24 感染 U251 细胞后能明显抑制细胞生长, 并能明显诱导细胞凋亡, 感染 72 h 后细胞凋亡率可达 42%, 感染 4 d 后细胞生长抑制率可达 50%。RT-PCR 检测发现 Ad-IL-24 能引起与细胞凋亡和血管形成相关基因 *bax/bcl-2*、*ICE*、*C-myc*、*p53* 的上调和 *HIF-1 α* 的下调, 并促进 Caspase-3 的活化。本研究结果显示 Ad-IL-24 能明显抑制人胶质瘤细胞 U251 生长和诱导细胞凋亡, 其抗肿瘤机制可能与通过 *bax/bcl-2*、*ICE*、*c-myc*、*p53* 的上调和 *HIF-1 α* 的下调, 进而导致 Caspase-3 的活化而诱导肿瘤细胞发生凋亡有关。

关键词: 腺病毒, 白介素-24, 基因治疗, 凋亡

Adenovirus mediated IL-24 gene expression inhibits growth of human glioma cell *in vitro*

Yunbo Shan, Weihua Sheng, Yufeng Xie, Tielian Liu, Yingying Jing, Zhiqing Hu, and Jicheng Yang

Department of Cellular and Molecular Biology, Medical School, Suzhou University, Suzhou 215123, China

Abstract: To investigate the inhibitory effect and anti-cancer mechanism of adenovirus mediated IL-24 gene expression on the human U251 glioma cell. U251 glioma cells were infected with Ad-IL-24 at various multiplicity of infection (MOIs). Cell proliferation was determined by MTT assay. Cell apoptosis was detected by flow cytometry and Hoechst staining. The transcription of apoptosis-related genes was analyzed by reverse transcription-PCR (RT-PCR), and the expression of Cleaved Caspase-3 was analyzed by Western blotting. The result showed that the growth of U251 glioma cells was significantly inhibited by Ad-IL-24 at the MOI of 100. The apoptotic rate of U251 glioma cells was 42% 72 h after infection with Ad-IL-24. Four days after infection, the growth of the U251 glioma cells was inhibited to 50%. RT-PCR showed that Ad-IL-24 not only up-regulated expression of *bax/bcl-2*, *ICE*, *C-myc*, *p53* and down-regulated the expression of *HIF-1 α* , but also enhanced Caspase-3 activation, eventually resulting apoptosis. Taken together, these results suggest that infection of U251 glioma cells with Ad-IL-24 can inhibit growth and induce apoptosis significantly by the regulation of apoptosis-related genes.

Keywords: adenovirus, interleukin-24, gene therapy, apoptosis

白细胞介素-24(Interleukin-24, IL-24)基因又称黑色素瘤相关基因-7(Melanoma differentiation

associated gene-7, MDA-7), 是 Jiang 等^[1]运用减数杂交法于 1995 年首次发现, 后从结构、染色体定位、

Received: October 8, 2008; Accepted: December 18, 2008

Corresponding author: Jicheng Yang. Tel: +86-512-65880107; E-mail: jcyang@suda.edu.cn

碱基序列同源性及细胞因子特性等方面综合考虑,将其归入 IL-10 家族,并命名为 IL-24^[2]。研究表明 IL-24 基因表达不仅具有免疫调节功能,而且还能抑制多种肿瘤细胞生长和肿瘤新血管形成并诱导细胞凋亡,但基本不会影响正常细胞生长。目前的研究提示,IL-24 基因是又一个既能抑制肿瘤细胞生长和血管形成并诱导凋亡,同时又能刺激免疫细胞表达细胞因子的新型抑癌基因^[3,4]。脑胶质瘤是中枢神经系统最常见的恶性肿瘤,约占所有脑肿瘤的 50%,但经常规疗法如手术、放疗及化疗,多数患者预后不佳。随着分子生物学和基因工程技术的发展,开展对脑胶质瘤的基因治疗是值得研究的一个方向^[5,6]。本实验室研究表明,IL-24 基因表达不仅在体内外对胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌和黑色素瘤等的生长均有明显抑制作用和诱导肿瘤细胞凋亡功能,而且对肿瘤周围新生血管的形成也有显著抑制作用^[7-16]。在此基础上,本研究将 Ad-IL-24 感染 U251 人胶质瘤细胞,观察 Ad-IL-24 对 U251 人脑胶质瘤细胞的生长抑制和凋亡作用,并探讨 Ad-IL-24 对人胶质瘤细胞抑癌作用的分子机制,为胶质瘤基因治疗提供可靠的实验依据。

1 材料与方法

1.1 材料

U251 人脑胶质瘤细胞、WI-38 正常人胚肺二倍体成纤维细胞、Ad-IL-24、空载体腺病毒(Ad-GFP)等均为本实验室保存;引物均由上海 Sangon 合成(表 1);RPMI-1640 购自美国 Hyclone 公司;胎牛血清购自杭州赛乐生物有限公司;MTT 购自 Sigma 公司;Annexin-v-PE/7-AAD 凋亡试剂盒购于 Southern

Biothec 公司;Hoechst33258 染色试剂盒为南京凯基生物科技发展有限公司产品,一抗 Cleaved Caspase-3 购自美国 Cell Signalling 公司、抗 hIL-24 抗体购自美国 R&D 公司,二抗均购于武汉博士德生物有限公司。

1.2 方法

1.2.1 不同 MOI 的 Ad-IL-24 对 U251 人脑胶质瘤细胞生长的影响

将处于对数生长期的 U251 胶质瘤细胞和 WI-38 人胚肺正常细胞,经 0.25% 胰酶消化制备细胞悬液,调整细胞浓度为 1×10^5 个/mL,每孔 100 μ L 接种于 96 孔培养板,37°C、5% CO₂ 培养过夜。次日分别以 1、50、100 MOI Ad-IL-24 和 Ad-GFP 不同剂量感染 U251 胶质瘤细胞和 WI-38 人胚肺正常细胞,各分 3 组:细胞对照组(PBS 组)、空载体对照组(Ad-GFP 组)和实验组(Ad-IL-24 组)。感染 48 h 后在荧光显微镜观察,并在感染 96 h 后每孔加 MTT(5 mg/mL)10 μ L,继续孵育 4 h 后加入 10% SDS-HCl 终止液,100 μ L/孔,于 37°C 充分溶解后,用酶联免疫检测仪检测 OD₅₇₀ 值,以 OD 值为纵坐标,以 MOI 为横坐标绘制细胞生长曲线图。旨在筛选最佳感染剂量的重组腺病毒进行生物学功能研究。

1.2.2 腺病毒介导的外源性 IL-24 基因在 U251 细胞中表达的鉴定

按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量,将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 U251 细胞(细胞数为 1×10^6),分 3 组同上述,感染 72 h 后离心收集细胞,分别抽提总 RNA 和裂解细胞提取蛋白进行 IL-24 基因的 RT-PCR 和 Western blotting 鉴定。实验方法见文献[16]。

表 1 PCR 引物

Table 1 Primers for PCR

	Sense	Antisense
<i>IL-24</i>	P1: 5'-gcactcgagaccatgaatttcaacagaggctgca-3'	P2: 5'-gcttctagatcagagctttagaatttctg-3'
<i>bcl-2</i>	P3: 5'-tgtggcctttcttgagttgc-3'	P4: 5'-ctaccagcctccgttacc-3'
<i>Bax</i>	P5: 5'-ggatgctccaccaagaa-3'	P6: 5'-gcactcccaccacaaaga-3'
<i>ICE</i>	P7: 5'- acatcctcaggctcagaagg -3'	P8: 5'- tgctgtcagaggtctgtgc -3'
<i>c-myc</i>	P9: 5'- tccactcgaaggactatcc -3'	P10: 5'- acgcacaagagtccgtagc -3'
<i>p53</i>	P11: 5'-cctcctcagcatcttatccg-3'	P12: 5'-cacaacacgcacctcaaaa-3'
<i>HIF-1α</i>	P13: 5'- gtccagatggtagcgac -3'	P14: 5'-gtggccgtccaacttc -3'
<i>β-actin</i>	P15: 5'- tgtttgagacctcaacccc -3'	P16: 5'- aggaaggctggaagagtc -3'

1.2.3 MTT 法检测 Ad-IL-24 对 U251 胶质瘤细胞的生长影响

将处于对数生长期的 U251 胶质瘤细胞, 胰酶消化后, 用完全培养基悬浮制成单细胞悬液, 计数后调整细胞浓度按每孔 1×10^4 个/100 μL 接种于 96 孔板, 待细胞贴壁后, 按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量感染 U251 胶质瘤细胞, 分 3 组同上述, MTT 检测 0~4 d 的细胞生长活力, 并绘制生长曲线。实验方法见文献[9]。

1.2.4 Annexin-V-PE/7-AAD 双染 FCM 检测 Ad-IL-24 对诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡的影响

按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量, 将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染处于对数生长期的 U251 胶质瘤细胞, 分 3 组同上述。37°C、5% CO_2 相同条件下培养 72 h 后收集细胞, PBS 清洗 2 次, 用 $1 \times$ binding buffer 调节细胞至 $10^6 \sim 10^7$ 个/mL, 取细胞悬液 100 μL 于流式管中, 加入 10 μL Annexin-V-PE 于冰上混匀, 避光 15 min, 再加 $1 \times$ binding buffer 380 μL , 最后再加 10 μL 7-AAD, 进行流式细胞仪检测。

1.2.5 Hoechst 法检测 Ad-IL-24 对 U251 胶质瘤细胞的核形态学改变

将洁净无菌的盖玻片置于 6 孔板内, 分别种入 U251 细胞, 在 37°C、5% CO_2 下培养至玻片表面达 50%~80% 贴满细胞时, 按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量, 将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 6 孔板中贴片的 U251 细胞, 分 3 组同上述, 培养 72 h 后进行 Hoechst 染色。实验方法见文献[9]。

1.2.6 RT-PCR 检测 ICE、C-myc、bcl-2、bax、p53 和 HIF-1 α 基因的转录情况

按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量, 将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 U251 胶质瘤细胞(细胞数为 1×10^6), 分 3 组同上述。感染 48 h 收集细胞提取总 RNA, 引用表 1 中各自的引物(P3~P16)分别进行 RT-PCR 检测 ICE、C-myc、bcl-2、bax、p53 和 HIF-1 α 基因在 U251 胶质瘤细胞中的转录表达水平。PCR 的体系为 94°C 4 min; 94°C 30 s, 55°C 45 s, 72°C 1 min, 30 个循环; 72°C 延伸 10 min。

1.2.7 Western blotting 检测 Cleaved Caspase-3 的表达情况

按 1.2.1 筛选的腺病毒最佳感染剂量, 将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染 U251 胶质瘤细胞(细胞

数为 1×10^6), 分 3 组同上述。感染 72 h 收集细胞加细胞裂解液, 充分裂解后 12 000 r/min 离心 5 min, 取总蛋白上清, 加 SDS 蛋白上样缓冲液, 混匀, 煮沸 5 min, 进行 SDS-PAGE 电泳, 再将凝胶电泳的蛋白条带转移到 NC 膜(硝酸纤维素膜)上, 经 5% 脱脂奶粉 37°C 封闭 1 h; 加入兔抗人 Cleaved Caspase-3(1:1000), 37°C 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 再加 HRP 标记的山羊抗兔 IgG 二抗, 37°C 作用 1 h, TBST 洗涤 3 次, 每次 5 min; 最后将 NC 膜与发光工作液(A 和 B 溶液等体积混合)充分接触, 室温孵育 3 min, 暗室进行压片曝光、显影和定影。

1.2.8 统计学处理

所有数据用 $\bar{x} \pm s$ 表示, 用 SPSS10.0 统计学软件包进行单因素方差分析, $P < 0.05$ 视为统计学有显著性差异。

2 结果

2.1 不同 MOI Ad-IL-24 对 U251 和 WI-38 细胞生长的影响

将 Ad-IL-24 和 Ad-GFP 以 1、50、100 MOI 不同剂量分别感染 U251 胶质瘤细胞和 WI-38 人胚肺正常细胞。感染 48 h 后, 在荧光显微镜下和普通光学镜视野下观察胶质瘤细胞和人胚肺正常细胞 WI-38 的形态。如图 1A 所示, 此结果表明在 50 MOI 时腺病毒对 U251 胶质瘤细胞和 WI-38 人胚肺正常细胞的感染效率可达 95% 以上。在 96 h 后, MTT 检测后绘制细胞生长曲线图。由图 1B 可见, Ad-IL-24 对 U251 胶质瘤细胞有明显的生长抑制作用, 与 Ad-GFP 组和 PBS 组比较显示: 在 100 MOI 时 Ad-IL-24 对 U251 胶质瘤细胞的生长抑制作用呈显著性差异($P < 0.05$), 但对正常二倍体细胞 WI-38 几乎无细胞毒作用。结果表明 100 MOI Ad-IL-24 具有特异性抑制 U251 胶质瘤细胞生长的作用, 而对正常二倍体细胞几乎无细胞毒作用。提示 100 MOI 感染剂量为 Ad-IL-24 感染胶质瘤细胞 U251 的最佳剂量。

2.2 腺病毒介导的外源性 IL-24 基因在 U251 胶质瘤细胞中表达的鉴定

以 100 MOI Ad-IL-24 和 Ad-GFP 分别感染胶质瘤细胞 U251 72 h 后, 收集细胞抽提总 RNA 和裂解提取蛋白, 分别进行 RT-PCR 和 Western blotting 鉴定, 以检测 IL-24 基因在胶质瘤细胞 U251 中的表

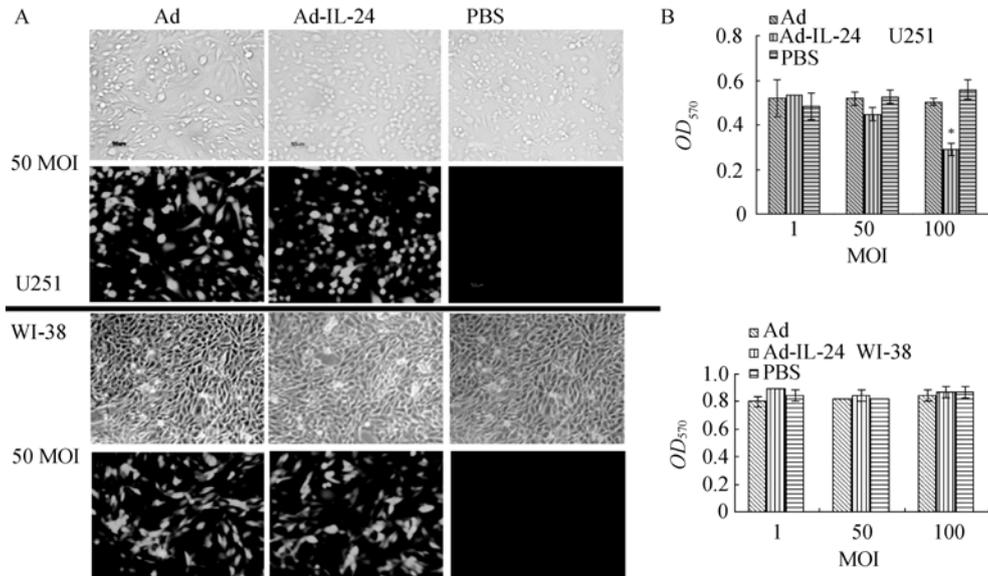


图 1 重组腺病毒 Ad-IL-24 感染 U251 细胞和 WI-38 细胞照片及细胞毒作用

Fig. 1 Cytotoxic effect of Ad-IL-24 on U251 cells and WI-38 cells. (A) Picture of U251 cells and WI-38 cells infected with Ad-IL-24 at the MOI of 50. (B) Cytotoxic effect of Ad-IL-24 (MOI of 1, 50, 100) on U251 cells and WI-38 cells. $\bar{x} \pm s$, $n=3$ replicates per condition. * $P<0.05$ vs PBS or Ad-GFP.

达。RT-PCR 检测结果(图 2A)显示, Ad-IL-24 组的 IL-24 和 β -actin 均出现阳性条带; Ad-GFP 组和 PBS 组均只有 β -actin 出现阳性条带; Western blotting 检测结果(图 2B)显示, Ad-IL-24 组产生了与抗 IL-24 抗体结合的特异条带, 而 Ad-GFP 组和 PBS 组则在相应位置均未出现上述条带。结果表明腺病毒介导的外源性 IL-24 目的基因能在 U251 胶质瘤细胞中成功进行该基因 mRNA 转录和 IL-24 蛋白表达。

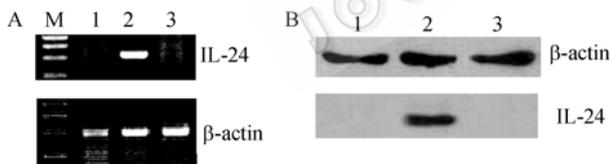


图 2 腺病毒介导的 IL-24 基因在 U251 细胞中表达的鉴定

Fig. 2 The expression of IL-24 in U251 cells infected with Ad-IL-24. (A) RT-PCR analysis transcriptional expression of IL-24 in U251 cells. M: marker 2000; 1: Ad; 2: Ad-IL-24; 3: PBS. (B) Western blotting analysis expression of IL-24 in U251 cells. 1: Ad-GFP; 2: Ad-IL-24; 3: PBS.

2.3 MTT 法检测 Ad-IL-24 对 U251 胶质瘤细胞的生长抑制作用

分别用 100 MOI Ad-GFP 和 Ad-IL-24 感染 U251 胶质瘤细胞, MTT 检测并绘制 0~4 d 细胞生长曲线图(如图 3)。由图解可见 Ad-IL-24 对 U251 细胞有明显的生长抑制作用, 其中第 4 天生长抑制率可达 50%左右, 与 Ad-GFP 组和 PBS 组比较呈显著性差

异($P<0.05$)。结果表明, 腺病毒介导的 IL-24 基因表达具有特异性抑制胶质瘤细胞生长的作用, 而 Ad-GFP 对胶质瘤细胞生长的毒副作用不明显。

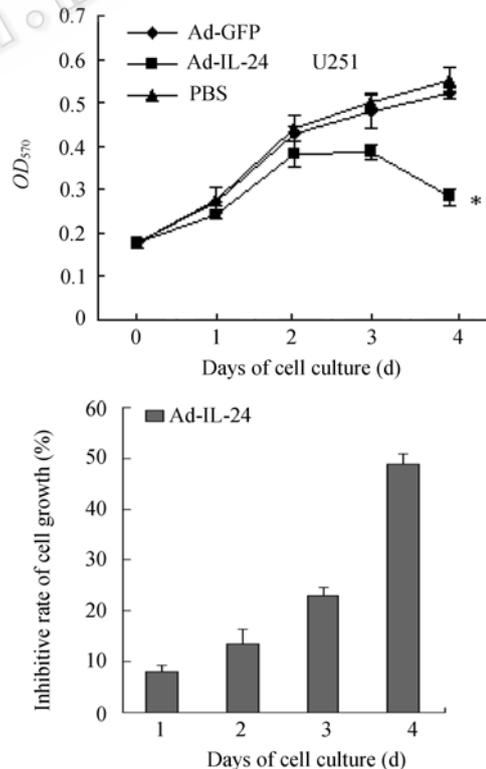


图 3 Ad-IL-24 对 U251 细胞生长的抑制作用

Fig. 3 Ad-IL-24 suppresses U251 cells growth *in vitro*. (A) Cytotoxic effect of Ad-IL-24 on U251 cells. $\bar{x} \pm s$, $n=3$ replicates per condition. * $P<0.05$ vs. PBS or Ad-GFP. (B) The inhibitory rate of Ad-IL-24 on U251 cells.

2.4 Annexin-V-PE/7-AAD 双染法的 FCM 检测肿瘤细胞凋亡

以 100 MOI Ad-GFP 和 Ad-IL-24 分别感染 U251 胶质瘤细胞, 72 h 后经 Annexin-V-PE/7-AAD 双染后用流式细胞仪检测细胞凋亡(图 4)。由图 4 可见 Ad-IL-24 能明显诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡, 其中凋亡率可达 42% 左右, 与 Ad-GFP 组和细胞对照的 PBS 组比较呈显著性差异($P < 0.05$)。

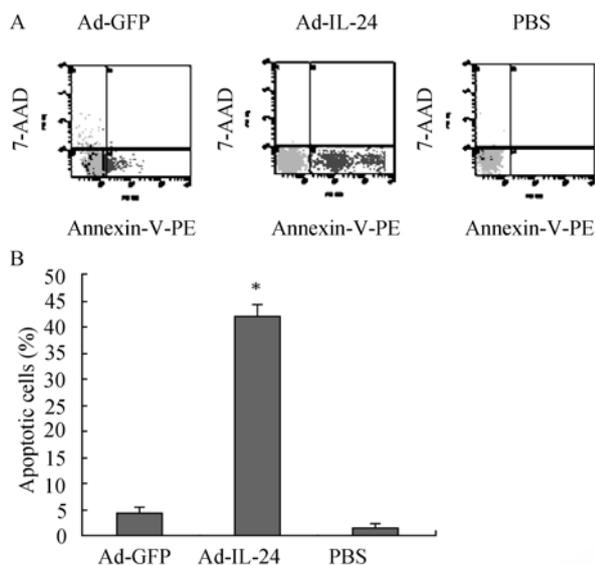


图 4 流式细胞仪检测 U251 细胞凋亡
Fig. 4 Apoptosis of U251 cells analysis by flow cytometry. (A) Apoptosis analysis using Annexin-V-PE/7-AAD double staining. (B) The apoptotic rate of U251 cells.

2.5 Ad-IL-24 诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡的核形态学变化

分别用 100 MOI Ad-GFP 和 Ad-IL-24 感染 U251 胶质瘤细胞, 72 h 后用 Hoechst 核荧光染料着色, 在荧光显微镜下观察细胞凋亡的核形态变化。由图 5 可见, Ad-IL-24 组中 U251 的细胞核均出现深染、固缩, 甚至断裂, 呈现典型的细胞凋亡核形态特征, 而 PBS 组和 Ad-GFP 组中 U251 胶质瘤细胞的细胞核形态正常, 未出现上述细胞凋亡的特征。Hoechst 核荧

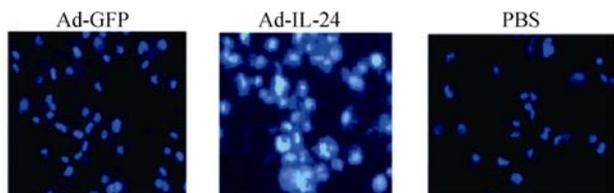


图 5 Hoechst 染色检测 U251 细胞凋亡的核形态学变化
Fig. 5 Apoptosis of U251 cells detected by Hoechst staining.

光染色结果进一步表明, Ad-IL-24 具有诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡的效应。

2.6 RT-PCR 检测 bcl-2、bax、ICE、C-myc、p53 和 HIF-1 α 基因的转录

以 100 MOI Ad-GFP 和 Ad-IL-24 分别感染 U251 胶质瘤细胞 48 h 后, 收集细胞抽提总 RNA, 用表 1 中各自上下游引物(P3~P16), 分别进行 RT-PCR 检测与细胞凋亡和血管形成相关基因 *ICE*、*C-myc*、*bcl-2*、*bax*、*p53* 和 *HIF-1 α* 基因表达的 mRNA 转录水平。由图 6 可见, 与 PBS 组和 Ad-GFP 组相比, 经 Ad-IL-24 作用的 U251 胶质瘤细胞中的 *ICE*、*C-myc*、*bax* 和 *p53* 基因转录明显上调, 而 *bcl-2* 和 *HIF-1 α* 基因则明显下调。结果表明 Ad-IL-24 抑制 U251 胶质瘤细胞生长并诱导其凋亡的机制可能与上调 *ICE*、*C-myc*、*bax* 和 *p53* 基因表达和下调 *bcl-2* 和 *HIF* 基因表达相关。

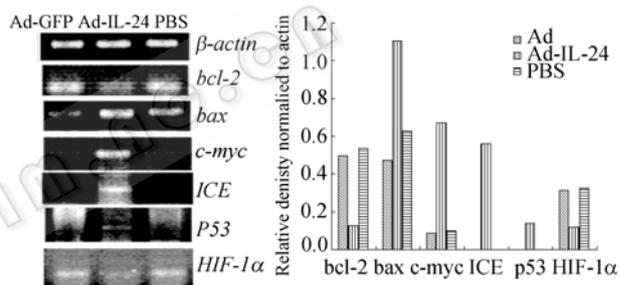


图 6 RT-PCR 检测 U251 细胞中凋亡相关基因
Fig. 6 Transcription of apoptosis-related genes in U251 cells detected by RT-PCR.

2.7 Western blotting 检测 Cleaved Caspase-3 的表达情况

经 Ad-GFP 和 Ad-IL-24 分别感染的 U251 胶质瘤细胞后, 用细胞裂解提取的总蛋白进行 SDS-PAGE 电泳和 Western blotting 分析, 以检测 Caspase-3 酶切活化的 Cleaved Caspase-3 在 U251 胶质瘤细胞中的表达。如图 7 所示, Ad-IL-24 组的蛋白电泳凝胶中产生 17 kD 和 19 kD 酶解条带, 并能与抗 Cleaved Caspase-3 抗体结合后呈现特异性条带, 而 Ad-GFP 组和 PBS 组则在相应位置均未出现上述条带。Western blotting 检测结果显示腺病毒介导的 IL-24 基因表达在 U251 细胞中激活 Caspase-3 并产生 17 kD 和 19 kD 的活化 Cleaved Caspase-3。结果表明 Ad-IL-24 是通过激活 Caspase-3 诱导 U251 胶质瘤细胞凋亡的。

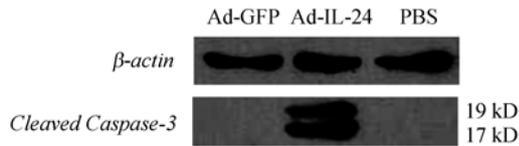


图 7 Western blotting 检测 U251 细胞中 Cleaved Caspase-3 的表达

Fig. 7 Expression of Cleaved Caspase-3 in U251 cell detected by Western blotting.

3 讨论

恶性胶质瘤是一种最常见的中枢神经系统恶性肿瘤,具有无限制恶性增生,富于血管形成和转移侵袭性强等生物学特性。外科手术切除后,恶性胶质瘤病人往往会在6个月复发,首次发病后1~2年内死亡,即使采取放疗、化疗。常规治疗措施也均不理想,目前还没有特异有效的治疗方法。近年来,随着分子生物学、分子遗传学和基因工程技术的发展,基因治疗的研究已倍受关注成为热点,为恶性胶质瘤的治疗开辟了新的治疗策略^[5,6]。

IL-24 又称黑色素瘤分化相关因子-7(mda-7),既能抑制多种实体瘤细胞生长和新血管形成并诱导凋亡,同时也能诱导慢性淋巴细胞白血病细胞凋亡,还能增加 CIK 细胞对肿瘤细胞的杀伤活性,但基本不会影响正常细胞,有人称为 IL-24 基因表达产物是一种神奇的导弹^[3,4,13,17-19]。目前研究显示 IL-24 抗肿瘤的作用机制主要有3条途径^[20]: 1) 抑制肿瘤细胞侵袭转移和抗血管发生的作用; 2) 死亡受体介导的细胞凋亡通路; 3) 线粒体介导的细胞凋亡通路和内质网应激的细胞凋亡通路。各条信号转导通路之间有着交互作用,相互影响,相互转导。尽管不同类型的肿瘤细胞可通过不同的信号转导通路发生凋亡,但最后均需通过活化 Caspase-3 诱导细胞凋亡。

本实验通过用本室构建的复制缺陷型重组腺病毒介导的 IL-24 基因,开展了基因重组腺病毒 Ad-IL-24 对神经胶质瘤细胞的体外抑癌效应的实验研究。RT-PCR 和 Western blotting 检测证实,腺病毒介导 IL-24 基因在 U251 胶质瘤细胞中能成功获得表达。MTT 和 FCM 检测结果表明,腺病毒介导 IL-24 基因表达具有明显特异性抑制 U251 胶质瘤细胞生长和诱导凋亡,与 Ad-GFP 组和 PBS 组相比有统计学意义($P < 0.05$),但对 WI-38 人胚肺正常细胞无细

胞毒作用。经 Hoechst 染色在荧光显微镜下观察了细胞凋亡典型的核形态改变,进一步表明 IL-24 能诱导 U251 胶质瘤细胞发生凋亡并引进核形态学改变,而空载体未见诱导肿瘤凋亡的核形态学改变。ICE 基因与线虫细胞凋亡相关基因 Ced-3 有较高的同源性,是哺乳动物细胞的死亡基因^[21]; *C-myc* 基因最早于禽类骨髓瘤病毒 MC29 中发现的一种癌基因,研究表明它具有刺激细胞增殖和诱导细胞凋亡的双向调节作用,主要取决于其接受的外来信号^[22]; 缺氧诱导因子 HIF 是 1992 年发现的与恶性肿瘤生长进程密切相关的转录调节因子,对肿瘤生长、血管形成、侵袭、转移和肿瘤组织化疗敏感性等方面都有显著影响^[23-29]。通过 RT-PCR 和 Western blotting 对 IL-24 抗肿瘤分子机制的研究表明,IL-24 作用后的 U251 细胞的促凋亡基因 *bax* 的转录水平明显上升,抗凋亡基因 *bcl-2* 的转录水平则是明显下降,近而导致 *bax/bcl-2* 比值明显升高,因此可加速细胞凋亡;同时原癌基因 *c-myc*、凋亡相关基因 *ICE* 和抑癌基因 *p53* 的转录水平也明显上升;而与肿瘤血管形成相关的缺氧诱导因子 *HIF-1 α* 基因的转录水平则明显下降;最终促使 Caspase-3 被激活而剪切产生活化的 Cleaved Caspase-3 片段,说明 IL-24 通过下调 *HIF-1 α* 基因表达抑制肿瘤血管形成和上调 *bax/Bcl-2*、*C-myc*、*ICE* 和 *p53* 基因表达促使 Caspase-3 活化而诱导肿瘤细胞凋亡来发挥抗肿瘤效应,同时通过下调 *HIF-1 α* 基因对提高肿瘤细胞对放疗化疗敏感性方面也有着重要的意义。实验提示,Ad-IL-24 具有显著抑制 U251 神经胶质瘤细胞生长的抑癌功能,本研究为 Ad-IL-24 对人胶质瘤基因治疗的有效性及其作用的分子机制提供了可靠的实验依据。

REFERENCES

- [1] Jiang H, Lin JJ, Su ZZ, *et al*. Subtraction hybridization identifies a novel melanoma differentiation associated gene, med-7, modulated during human melanoma differentiation, growth and progression. *Oncogene*, 1995, **11** (12): 2477-2486.
- [2] Caudelle G, Mumm JB, Poindexter N, *et al*. The protein product of the tumor suppressor gene, melanoma differentiation-associated gene 7, exhibits immunostimulatory activity and is designated IL-24. *J Immunol*, 2002, **168**(12): 6041-6046.

- [3] Lebedeva IV, emdad L, Su ZZ, *et al.* mda-7/IL-24, novel anticancer cytokine: Focus on bystander antitumor, radiosensitization and antiangiogenic properties and overview of the phase I clinical experience. *Int J Oncol*, 2007, **31**(5): 985–1007
- [4] Huang EY, Madireddi MT, Fisher PB, *et al.* Genomic structure, chromosomal localization and expression profile of a novel melanoma differentiation associated (mda-7) gene with cancer specific growth suppressing and apoptosis inducing properties. *Oncogene*, 2001, **20**(48): 7051–7063.
- [5] Castro MG, Cowen R, Williamson IK, *et al.* Current and future strategies for the treatment of malignant brain tumors. *Pharmacol Ther*, 2003, **98**(1): 71–108.
- [6] Phuong LK, Allen C, Peng KW, *et al.* Use of a vaccine strain of measles virus genetically engineered to produce carcinoembryonic antigen as a novel therapeutic agent against glioblastoma multiform. *Cancer Res*, 2003, **63**(10): 2462–2469.
- [7] Xie YF, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Recombinant human IL-24 suppresses lung carcinoma cell growth via induction of cell apoptosis and inhibition of tumor angiogenesis. *Cancer Biother Radio*, 2008, **23**(3): 310–320.
- [8] Zhao XY, Sheng WH, Yang JC, *et al.* The tumor-suppressing effects of rhIL-24 protein on B16 cells *in vitro* and *in vivo*. *Jiangsu Med J*, 2006, **32**(12): 1125–1128.
赵小瑜, 盛伟华, 杨吉成, 等. rhIL-24 对黑色素瘤 B16 细胞的体内外抑瘤作用. *江苏医药*, 2006, **32**(12): 1125–1128.
- [9] Yan S, Xie XF, Yang JC, *et al.* Study of effects of rhIL-24 on the growth gastric cancer cell line *in vitro* and its mechanism. *Suzhou University J Med Sci*, 2006, **26**(3): 370–374.
严苏, 谢宇锋, 杨吉成, 等. rhIL-24 基因抑制胃癌生长及作用机制的实验研究. *苏州大学学报(医学版)*, 2006, **26**(3): 370–374
- [10] Wang XH, Wang JZ, Yang JC, *et al.* The study of the growth-suppression and mechanisms of Hepatocellular carcinoma tumor in nude Mice. *Chin J Biotech*, 2006, **22**(6): 925–930.
汪小华, 王金志, 杨吉成, 等. 腺病毒介导 hIL-24 抑制裸鼠肝癌荷瘤生长及其机制研究. *生物工程学报*, 2006, **22**(6): 925–930.
- [11] Yan S, Yang JC, Cheng WC, *et al.* Growth-suppression of rhIL-24 on gastric cancer in nude mice. *Chin J Digest*, 2007, **27**(8): 555–556.
严苏, 杨吉成, 陈卫昌, 等. 重组人白细胞介素-24 对裸鼠人胃癌移植瘤生长的抑制作用. *中华消化杂志*, 2007, **27**(8): 555–556.
- [12] Wei SH, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Immunostimulation and depressant effects of rhIL-24 protein on angiopoiesis *in vitro*. *Jiangsu Med J*, 2007, **33**(3): 273–276.
危少华, 盛伟华, 杨吉成, 等. 人 IL-24 重组蛋白免疫刺激及血管形成抑制作用. *江苏医药*, 2007, **33**(3): 273–276.
- [13] Zhu YH, Ye ZM, Yang JC, *et al.* Study of effects of rhIL-24 on the growth and angiogenesis of lung cancer A549 cell *in vitro*. *Chin J Tuberc Respir Dis*, 2006, **29**(3): 203–205.
朱晔涵, 叶震敏, 杨吉成, 等. 重组人白细胞介素 24 对肺癌 A549 细胞生长和肿瘤血管生成影响的实验研究. *中华结核和呼吸杂志*, 2006, **29**(3): 203–205.
- [14] Pan XT, Sheng WH, Yang JC, *et al.* Inhibition of pancreatic carcinoma growth by adenovirus-mediated human interleukin-24 expression in animal model. *Cancer Biother Radio*, 2008, **23**(4): 425–434.
- [15] He TC, Zhou S, Da Costa LT, *et al.* A simplified system for generating recombinant adenoviruses. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, **95**(5): 2509–2514.
- [16] Ye ZM, Zhang SW, Miao JC, *et al.* The Construction and identification of recombinant adenovirus vector of hIL-24. *Suzhou Univ J Med Sci*, 2006, **26**(1): 44–46.
叶震敏, 张颂文, 杨吉成, 等. 人白介素 24 腺病毒载体的构建和鉴定. *苏州大学学报(医学版)*, 2006, **26**(1): 44–46.
- [17] Yuan YT, Wang ZH, Sun XW, *et al.* Effects of interleukin-24 on the cytotoxic activity cytokine-induced killer cells. *World Chin J Digestol*, 2007, **15**(6): 548–553.
袁玉涛, 王志华, 孙喜文, 等. IL-24 对细胞因子诱导的杀伤细胞的作用. *世界华人消化杂志*, 2007, **15**(6): 548–553.
- [18] Zhang Zb, Liang JQ, Yuan YT, *et al.* IL-24 enhances the cytotoxic activity of CIK cell against HepG2 cell. *J Harbin Med Univ*, 2007, **41**(5): 418–421.
张志斌, 梁景秋, 袁玉涛, 等. IL-24 增强细胞因子诱导的杀伤细胞对 HepG2 的细胞毒活性. *哈尔滨医科大学学报*, 2007, **41**(5): 418–421.
- [19] Sainz-Perez A, Gary-Gouy H, Dalloul A, *et al.* IL-24 induces apoptosis of chronic lymphocytic leukemia B cells engaged into the cell cycle through dephosphorylation of STAT3 and stabilization of p53 expression. *J Immunol*, 2008, **181**(9): 6051–6060.
- [20] Sarkar D, Lebedeva IV, Gupta P, *et al.* Melanoma differentiation associated gene-7 (mda-7)/IL-24: a magic bullet for cancer therapy? *Expert Opin Biol Th*, 2007, **7**(5): 577–586.
- [21] Miura M. Ice/ced-3 family gene and apoptosis. *Jap J Clin Med*, 1996, **54**(7): 1860–1868
- [22] Robson S, Pelengaris S, Khan M. c-Myc and downstream targets in the pathogenesis and treatment of cancer. *Rec Patents Anti-Cancer Drug Disc*, 2006, **1**(3): 305–326.

- [23] Semenza GL, Wang GL. A nuclear factor induced by hypoxia via denovoprotein synthesis binds to the human erythropoietin gene enhance ratasite required fortranscriptional activation. *Mol Cell Biol*, 1992, **12**(12): 5447-5456.
- [24] Kunz M, Ibrahim SM. Molecular responses to hypoxia in tunlor cells. *J Mol Cancer*, 2003, **2**(1): 19-23.
- [25] Duff JP, Eibl G, Reber HA, *et al*. Influence of hypoxia and neoangiogenesis on the growth ofpancreatic cancer. *J Mol Cancer*, 2003, **2**(5): 12-22.
- [26] Yu RT, Chen R, Tang H, *et al*. Hammerhead ribozyme targeting human hypoxia inducible factor-1 α gene effectively attenuates HeLa xenograft tumors. *Surg Neurol*, 2008, **7**(3): 56-65.
- [27] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al*. Gene transfer of antisense hypoxia inducible factor-1 alpha enhances the therapeutic efficacy of cancer immunotherapy. *Gene Ther*, 2001, **8**(8): 638-645.
- [28] Sun X, Kanwar JR, Leung E, *et al*. Regression of solid tumors by engineered overexpression of von Hippel-Lindau tumor suppressor protein and antisense hypoxia-inducible factor-1alpha. *Gene Ther*, 2003, **10**(7): 2081-2089.
- [29] Semenza GL. Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat Rev Cancer*, 2003, **3**(10): 721-732.



科学出版社科学出版中心生命科学分社新书推介

环境基因组学实验指南（译）

（德）C.C.马丁 主编
杨军 主译

978-7-03-023317-2 ¥75.00 2008年12月出版

随着后基因组时代的到来，生命科学已从针对单个基因、单一细胞或个体的研究向整合的系统生物学方向发展。推动这一发展的核心力量就是新的高通量分析技术，如基因组学、蛋白质组学、代谢组学等技术的出现。许多传统的学科在与这些新兴技术结合后，得到了飞速的发展。正是在这样一种新“革命”形势下，本书应运而生。本书以方法学为主，集中介绍了在机体对环境应答中基因表达谱、全基因组和染色体突变，以及基因组多样性和多态性三方面检测的新技术、新进展。

本书对于从事环境科学、毒理学、生态学等相关学科的科研人员而言是一本极好的实验指南参考书。



逆境植物细胞生物学

简令成 王红著

978-7-03-022365-4 ¥70.00 2008年12月出版

本书分为两篇。第一篇是正常条件下植物细胞的结构与功能，包括11章，系统地叙述了植物细胞内各种细胞器的结构与功能，作为逆境中细胞结构与功能变化对比分析的基础。第二篇是低温、干旱和盐胁迫下植物细胞结构与功能的反应与适应，包括13章，叙述了各类细胞器的结构与功能、物质代谢以及基因表达在逆境中的变化，全面反映了当今国际上在植物抗寒、抗旱和抗盐机制及基因工程研究中细胞和分子水平上的最新研究成果，内容丰富，具有较高的学术水平。

本书可供综合性高等院校、农林院校及科研机构植物生物学、植物生理学、细胞生物学、分子生物学等专业的研究人员与教学人员、研究生和大学生参考。



欢迎各界人士邮购科学出版社各类图书（免邮费）

邮购地址：北京东黄城根北街16号 科学出版社 科学出版中心 生命科学分社 邮编：100717

联系人：阮芯 联系电话：010-64034622（带传真）

更多精彩图书请登陆网站 <http://www.lifescience.com.cn>